遠山椿吉記念　第１回　食と環境の科学賞　受賞記念講演録

ノロウイルスによる食中毒の発生要因の解明と予防策の樹立に関する研究

西尾　治
国立感染症研究所感染症情報センター　客員研究員

ノロウイルスは、昭和43年にアメリカのノーウォークで下痢症患者ふん便から発見され、ノーウォークウイルスとか小型球形ウイルス（SRSV）と呼ばれていましたが、平成14年に国際ウイルス命名委員会でノロウイルスと命名されました。国内では平成９年に、厚生省（現厚生労働省）は食品衛生法を改正して、食中毒病因物質にノロウイルス（当時は小型球形ウイルス）を加えました。翌年にはカキによるノロウイルス食中毒が発生した際に、早急にトレーサビリティを実施するために養殖海域を表示することとなりました。厚生労働省に届けられているノロウイルス食中毒事例は、平成18年の大流行を除きますと年間270件前後あります。ところが、問題はノロウイルス食中毒の患者数です。平成11年頃では食中毒患者の15％がノロウイルスを原因としましたが、年次とともに増加し、平成16年には40％を超し、平成18年には何と71％がノロウイルスで、食中毒の事件数はさほど増加していませんが、大規模な事例が多くなっています。平成18年では500人以上の規模の大規模食中毒事件７件中７件がノロウイルスであり、ノロウイルス食中毒防止対策が極めて重要になっています。

ノロウイルス食中毒の原因食品

ノロウイルス食中毒の原因食品は平成13年まではカキなどの二枚貝による事件が半数以上を占めていました（図１）。最近は二枚貝が著しく減少し、食品従事者がノロウイルスを汚染させたと考えられる食品が原因となっております。二枚貝以外にノロウイルスが特定された食品（ノロウイルスの汚染が認められた食品）は、すし、刺し身、あえ物、餡、パンなど、ノロウイルスに感染した人が素手で触って提供した食品です。

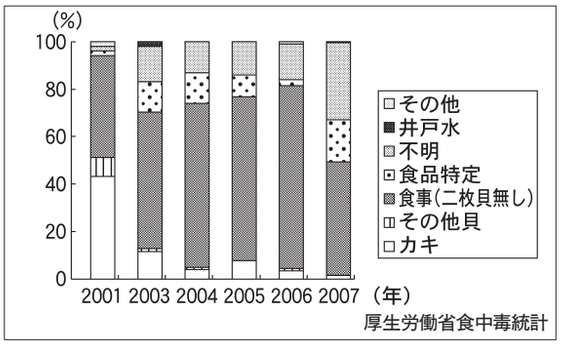

図１　2001～2007年のノロウイルスによる食中毒事件の食材別の事件数の推移（％）

ノロウイルスの特徴

ノロウイルスは直径38ナノメーター（nmは1/1,000,000mm）の大きさで、ウイルスの中でも最も小さいRNAウイルスです。構造蛋白と内部にプラス鎖RNAを持つ、単純な構造です。このウイルスは、他のウイルスと同様に食材や環境中では増殖できず、感染した人の小腸の上皮細胞のみで増殖します。また、人工培養の方法が開発されておりません。ノロウイルスの遺伝子型は34以上もあり、ワクチンによる予防対策も困難です。ノロウイルスの特徴は感染力が非常に強いということで、10～100個のウイルス粒子で感染、発病します。

ノロウイルス食中毒の症状

潜伏時間が24～48時間です。ノロウイルスは小腸で増殖し、小腸に炎症を起こします。主症状は水様性の下痢で、通常は２～３回で治癒しますが、重症の人は十数回続くこともあります。もう一つの特徴が、胃の運動神経の低下に伴う嘔吐です。これは、

食べたものが胃から腸に行かなくなるために、胃がひっくり返る強烈な嘔吐が起きます。そのために、腸の内容物が逆流して、嘔吐物と一緒にウイルスが排出され、嘔吐物が感染拡大の大きな要因になっています。その他の症状は発熱、筋肉痛、頭痛はいずれも軽度で、通常、１日から３日で治癒し、さほど重い病気ではありません。

ノロウイルスの検査法の普及活動

平成９年に厚生労働省がノロウイルスを食品衛生法による食中毒対象微生物にしたことから、急遽、全国の都道府県ならびに政令都市のウイルス担当者を対象に技術研修を実施し、その後も毎年ノロウイルスの研修を行っています。遺伝子診断に使用するプライマーあるいはウイルス粒子の濃縮法、回収法など新たな検査法の開発を行い平成15年に現在使用している標準検査法を確立し、現在までに、全国の都道府県のウイルス担当者、660名余について研修を行ない、検査の標準化、普及に努めてきました。

なお、演者らが作成したリアルタイムPCR法は、従来のPCR法では１～２日間要したものが７時間で結果が得られ、迅速性があります。また、免疫学的検査法（ELISA法）と比較した結果、リアルタイムPCR法ではふん便中に10^5個以上のウイルスが存在すれば、ほぼ100%が陽性となり、ELISA法では60%程度が陽性になるに過ぎないことから、リアルタイムPCR法は検出感度および検出率も高い方法です（表１）。

表１　ELISA法とNV遺伝子コピー数の比較

リアルタイムPCR 10^nコピー数/g	ELISA法	
	＋	－
11	0	2
10	14	4
9	18	9
8	17	8
7	9	7
6	1	6
5	0	5
計	61	39

大瀬戸光明ら：2006

カキへのノロウイルス汚染様式の解明と対策

カキはどのようにしてノロウイルスに汚染されるかといいますと、ノロウイルスに感染した人のふん便とともにノロウイルスが下水を通って下水処理場に行きます。ここでノロウイルスが完全に除去されればよいのですが、一部は下水処理場をくぐり抜けて、河川、海水に流れていきます（図２）。カキは旺盛な時に、１日にプランクトンを１億～10億個食べるために、海水を１時間に20リットルぐらい吸引します。この際に海域を汚染したノロウイルスがカキの中腸腺に取り込まれ、ウイルスが濃縮されます。

環境中のノロウイルスを定量的に調査した成績では、ノロウイルスの流行期の場合、下水処理場における流入水のノロウイルスは10^6個／Ｌ、それが下水処理場で処理され減少しますが、どうしても一部がくぐり抜けてきて、放流水に数十個含まれます（図３）。浄化施設のウイルス除去の悪いものですと、下水処理場で除去されるウイルス量は100分の１～1,000分の１ぐらいに減少し、10^2～10^3個／Ｌ

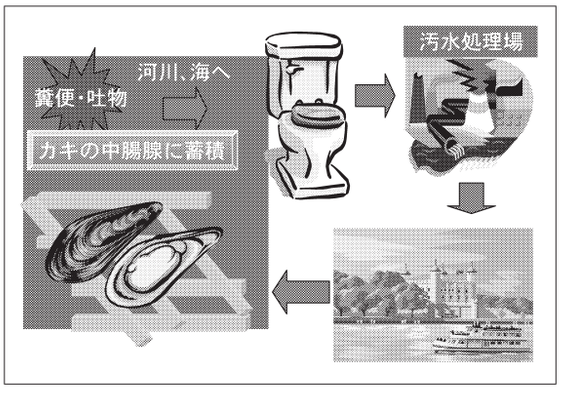

図２　カキのノロウイルス汚染様式

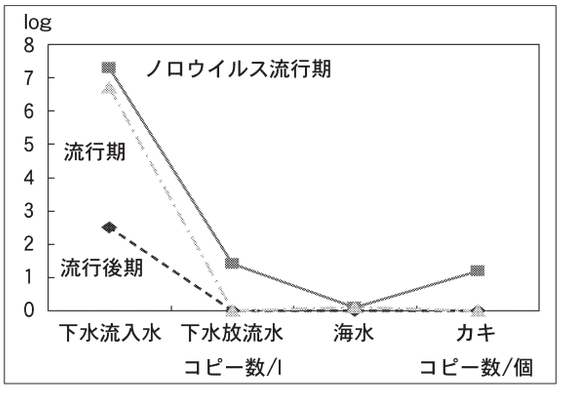

図３　環境中のノロウイルス消長

のウイルスが下水処理場から放流されます（図４）。従って、下水処理場の能力を高めることも重要な予防対策です。

流通している生食用カキのノロウイルス汚染状況を調査したところ、市販のパックごとに３個ずつ調べますと、３個すべて陰性というのは91.2%、２個が陰性で１個が陽性は6.5%、３個のうちの２個が陽性は2.0%、３個とも陽性が0.3%で、同一パック詰めのカキであっても、個々のカキでノロウイルス汚染は多様です（図５）。

カキの養殖筏の0.5m、4.5m、９mのところのカキを取って調べますと、上層部のカキの汚染率が高く、下層部のカキの汚染率が低い傾向が見られます（図６）。

大雨が降りますと、河川水は海水よりも比重が軽いために、海水の表面を流れ、養殖カキの上層部からカキがノロウイルスに汚染し、冬の場合には海水表面の温度が下がってきますから、比重が重たくなって対流が起き、下層部にノロウイルスの汚染が広がり、カキのノロウイルス汚染も上のほうから下

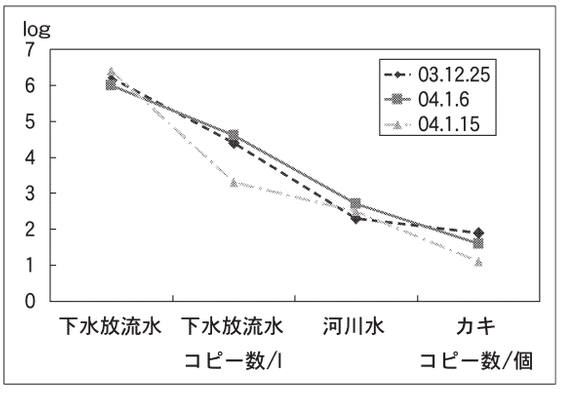

図４　環境中のノロウイルス消長(2)

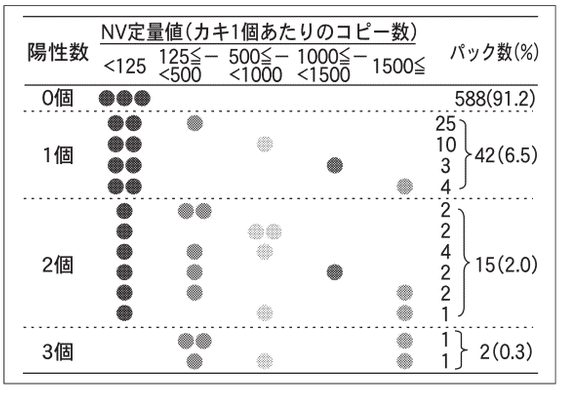

図５　同一パックのカキ個々のノロウイルス汚染量

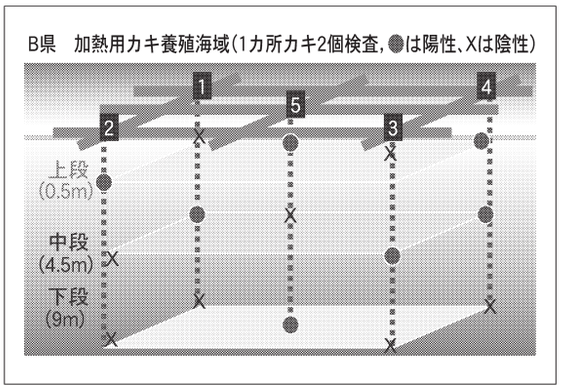

図６　カキ筏における水平・垂直汚染

になっていくと推察されます（図７）。

ノロウイルス食中毒とカキのノロウイルス汚染

カキに関連した食品が原因となったノロウイルス食中毒事件と市販カキのノロウイルス量を調査したところ、地域的な要因も考慮しなければなりませんが、カキのノロウイルス濃度が高いときにはやはり食中毒事件も多く報告されるという傾向にあります（図８）。

感染性胃腸炎患者の報告数とカキのノロウイルス汚染を月別に検討した結果では、11月ごろから感染性胃腸炎患者の報告が増加してきますが、その頃にはカキのノロウイルス汚染は見られませんが、その１カ月後ぐらいから、その地域のカキからノロウイルスが検出されてきます。すなわち、感染性胃腸炎患者が排出したノロウイルスが河川を汚染し、カキにノロウイルスが蓄積されて食中毒を起こすまでに約１カ月間を要すると考えられます。

なお、カキの中腸腺にノロウイルスが汚染していることを解明しましたが、カキ殻の表面にもノロウ

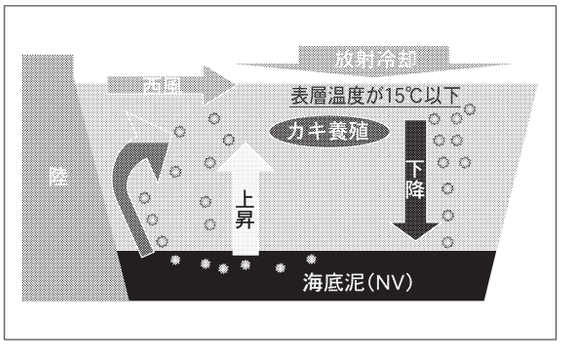

図７　冬期の海水の変化

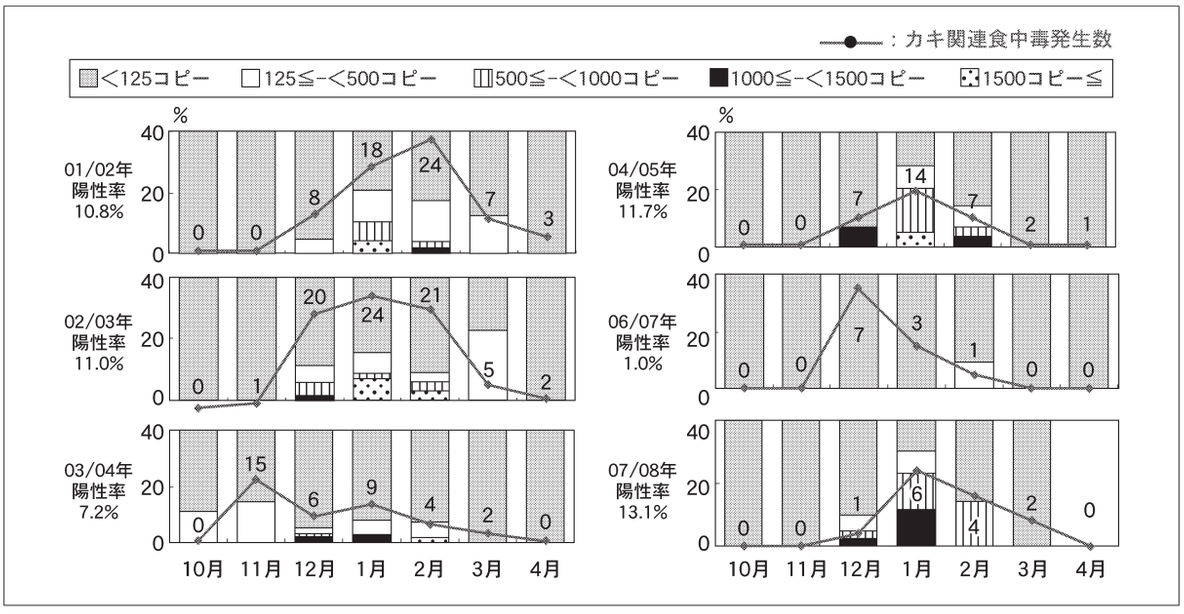

図８　月別NV汚染状況とカキ関連食中毒発生状況

イルス汚染があることも調査結果から明らかにすることができました。したがいまして、市販されているカキの容器中の海水にもノロウイルス汚染があり、カキのみならず容器の海水についても二次汚染防止の注意が必要です。

洗浄カキによるノロウイルス対策

カキがノロウイルス汚染する経路については解明できましたが、次にカキからいかにしてノロウイルスを除去するかが問題となります。ノロウイルスは培養できないために代替えとしてポリオウイルスとネコカリシウイルスで行った実験を紹介いたします。ポリオウイルスを２週間かけてカキに取り込ませると10^5～10^6個/カキ１個のウイルスがカキの中腸腺に蓄積されます。これに紫外線照射水による洗浄を行うと、時間とともにウイルスは減少いたしますが、48時間後でも数十個残り完全に除くことはできません。しかしながら、紫外線照射水の効果は確認されました。しかし、ネコカリシウイルスで同様の実験を行ったところ、10^2個程度しか中腸腺にネコカリシウイルスが蓄積するに過ぎず、紫外線照射水で24時間後には陰性となりました（図９）。一方、生食用カキでは紫外線照射水の浄化によるウイルス排出効果は少ないです。このカキにおける浄化効果

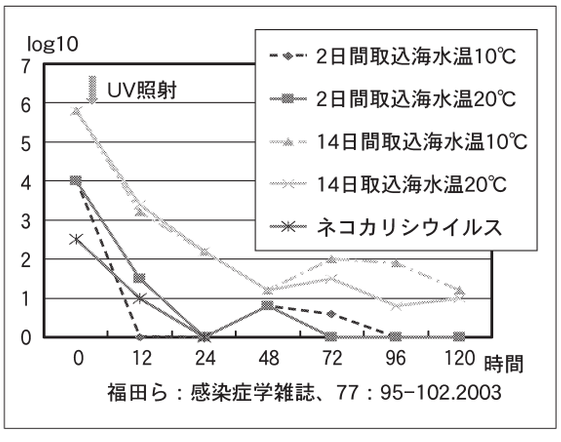

図９　カキの浄化試験（ポリオウイルス、ネコカリシウイルス添加）

の少ない要因としてカキの中腸腺細胞がノロウイルスと結合することによると考えられます。ノロウイルスとカキの中腸腺細胞との結合力の低いカキを見出せば、浄化効果も高まると推察されます。

輸入二枚貝のノロウイルス汚染と食中毒の危険性

国内には二枚貝が年間45,120トン（平成19年）輸入されていますし、市販のシジミやアサリの60%、ハマグリ、アカガイの90%が輸入品です。これらの輸入二枚貝のノロウイルス汚染は調査されていないことから、平成13年から平成19年の間に、約2,000

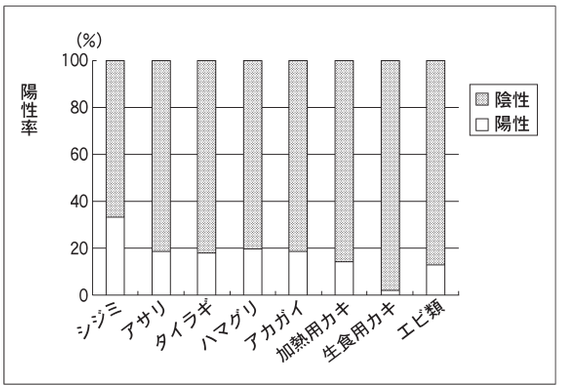

図10　輸入生鮮魚介類のノロウイルス汚染（2001～2007年）

件について調査を行った結果、シジミが33％で、アサリ、タイラギ、ハマグリ、アカガイのおよそ20％がノロウイルスに汚染されていました。加熱用カキが15％、生食用のカキが４％、エビ類の10％程度がノロウイルスで汚染されていることを明らかにいたしました（図10）。シジミは海域でなく、河川水の影響を多く受ける汽水域に生息していることから、ノロウイルス汚染率も高いと言えます。月別に調べますと、春期ではノロウイルス陽性率が23％、夏期が12％、秋期が16％、冬期が24％であり、輸入二枚貝では一年中ノロウイルス汚染が高く、食中毒を起こす危険性があります。

実際に輸入魚介類によるノロウイルスの食中毒は、平成13年７月に中国産ウチムラサキ貝によって23名の患者発生がありました。その年の12月にも中国産ウチムラサキ貝でノロウイルスの集団発生がありました。さらにその１カ月後に、中国産ウチムラサキ貝によるＡ型肝炎ウイルスの集団発生ありました。このように輸入食品では、ノロウイルス以外にもＡ型肝炎の食中毒事件も起こることがあり、注意を喚起しなければなりません。

ノロウイルス保有食品従事者とノロウイルスの環境汚染

ノロウイルス患者のふん便中へのウイルスの排出量を調査したところ、ふん便１gあたり、10^6～10^9個のノロウイルスが検出されました。そのうち約半数の患者で10^8～10^9個検出され、10^{10}個以上検出された患者が約10％認められます（図11）。ものすごいウイルス量を排泄しています。ですから、下水処理場にも大量のウイルスが流入してきます。

次に、発病者と非発病者のふん便中のノロウイルス量を検討したところ、ほとんどの発病者はふん便１gあたり10^8個以上ウイルスを排泄していますが、非発病者ではウイルス量の少ない人も多くみられますが、発病者と同様のウイルス量を排泄する人も多数認められます（図12）。発病者は症状があり、ノロウイルスに感染していることを認識して、予防対策が施せます。一方、集団発生の際に、発症しなかった人の約３割が非発病者であり、非発病者は健康であることからノロウイルスを大量に排泄していることの認識がなく、非発病者の手を介して食材や食品がノロウイルスに汚染する危険性があります。

非発病者（調理従事者）のふん便中へのノロウイルスの排出期間は３日目でふん便１gあたり10^4個程度の人もいますが、10～15日目でも10^7個も排泄す

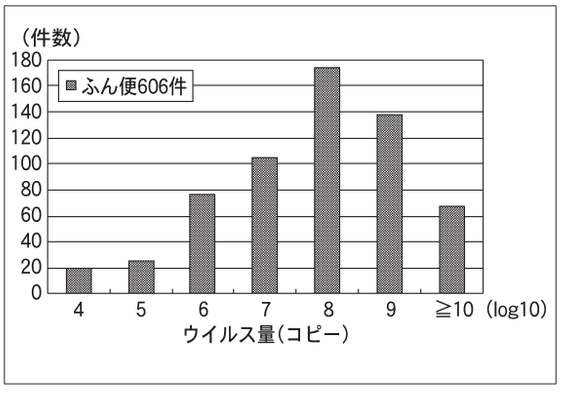

図11　患者ふん便中のノロウイルス量

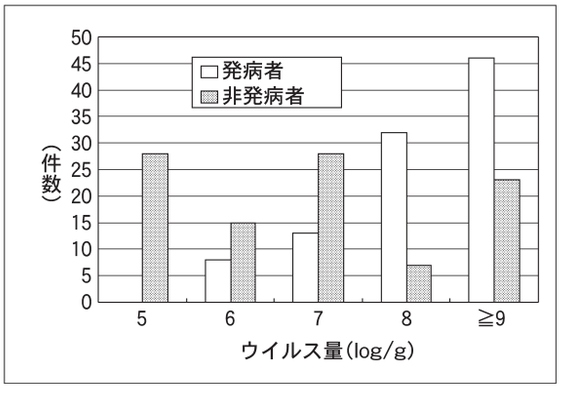

図12　発病者と非発病者のふん便中のノロウイルス量

る場合もあり、注意が必要です。すなわち、患者でも病気が治ったからウイルス排出もないとは言えず、ノロウイルス感染者は２週間程度の間、大量にウイルスの排泄が続くことを明らかにしてきました（図13）。

嘔吐物から腸管ウイルスが検出されることはあまり考えられませんが、ノロウイルスによる嘔吐物では１gあたり10^5〜10^8個含まれます。嘔吐物により環境が汚染されますし、学校や高齢者施設でのノロウイルス集団発生に嘔吐物がしばしば関与しており、ノロウイルスは嘔吐物を媒介として感染が拡大することを指摘できました。

ホテル42施設、旅館７施設を対象に冷蔵庫の取っ手、排水溝、トイレのドアノブについてノロウイルスの汚染状況をノロウイルスの流行の初期に調査したところ、全体の25％ぐらいの施設でノロウイルスが検出されています。ノロウイルスの汚染量は冷蔵庫の取っ手や排水溝では10〜1,000個以下でしたが、トイレのドアノブでは1,000個以上の大量の汚染も認められています。これは恐らく、ホテルや旅館の従業員で、ノロウイルスによる不顕性感染者あるいは、ノロウイルスに感染後下痢症状が治ってしまった人が何名かいたことによるものと考えられます。それらの従業員の手洗いが不十分なために、冷蔵庫の取っ手やトイレのドアノブにノロウイルスの汚染が起きたものと推察されます。これにより手洗いの重要なことが認識されます。

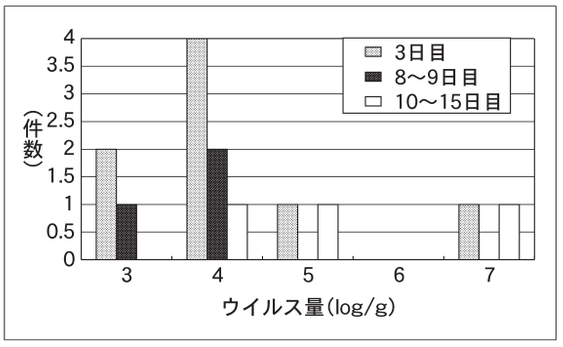

図13　調理従事者（非発症者）のノロウイルス排泄

調理従事者が原因でノロウイルス食中毒が発生した事例と問題点

平成15年に長崎のレストランで修学旅行生が食事をしたところ660名の患者が発生した食中毒事件があります。潜伏期間は30〜33時間で、典型的な発生状況です。このときにやはり従業員の５名の人からウイルスが検出され、従業員が食品を汚染したと考えられました。従業員はふん便１g中に３億〜100億個のウイルスを排出していました。原因となったレストランの環境調査では皿うどんの盛りつけ台やコンロ付近からもノロウイルスが検出され、ノロウイルスが厨房に広く汚染したことが証明されました（図14）。また、従業員と客が利用するトイレが調理施設の真ん中にあり、区別もされておらず、その

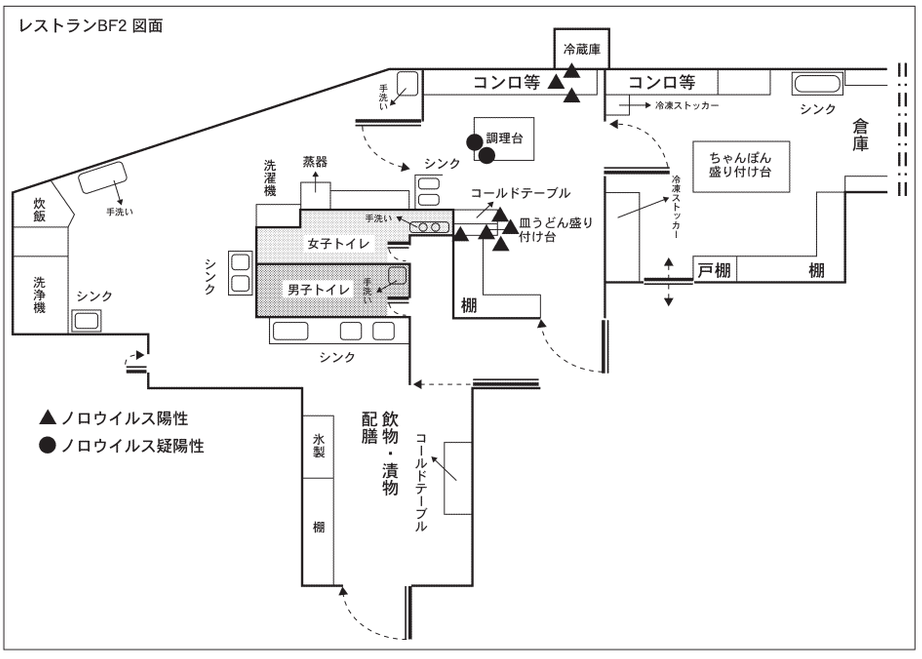

図14　レストラン図面

周辺からもノロウイルスが検出されました。こうした解析結果から、衛生管理として従業員トイレと客のトイレを別にすることの必要性を指摘しました。

そのほか、ノロウイルス検査が確立されたことにより飲料水によるノロウイルス食中毒を解明することもできました。また、嘔吐物や環境からのノロウイルスの検査法を確立したことにより、嘔吐物を介するノロウイルス感染症を解明した事例が多数あります。

ノロウイルス食中毒予防と手洗い

ノロウイルスの大きさは細菌に比べて30分の１～100分の１と小さく、さらにウイルスの中でも最も小さいこと、下痢便、嘔吐物中には大量にノロウイルスが含まれ、液状であり、手に付きやすい。しかも、大量のウイルスが手に付着し、手のしわの奥に入り込むために、容易に除去できません。従って、従業員対策としてはノロウイルスを除去できる手洗い方法が重要になります。

この問題に関しては文部科学省が平成20年３月に作成しました「学校給食調理場における標準的な手洗いマニュアル」（図15）の作成委員として参画しました。現在では学校給食施設のみならず、他の大量調理施設でも、このマニュアルを手洗い場に示しているところが多く見られます。

ノロウイルス患者から分離されたウイルスの遺伝子型

平成21年２月現在、ノロウイルスが大流行しておりますが、ＧⅡ/４株により起きています。1990年代の後半はＧⅡ/３株により流行が起きています。

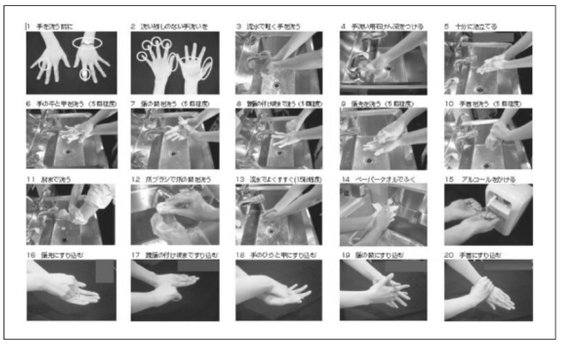

図15　学校給食における標準的な手洗いマニュアル　一覧表

ＧⅡ/４株は、平成14年にヨーロッパで新たな変異株が出現し、同時に、日本にこの株が入ってきていますが、幸いなことにこの年は日本では流行を起こしませんでした。ところが、平成16年に新たな変異株である、ＧⅡ/４.2004年型が出現しました。このときに広島の福山での高齢者施設の死亡例が見られ、新しいノロウイルスが殺人ウイルスだとかさんざん騒がれた年ですが、実はＧⅡ/４.2004年型による大流行でした。同年にはヨーロッパでも平成14年に比べ集団発生が30～100％増加しています。

平成18年に、ヨーロッパでさらにＧⅡ/４の変異株が出現し、2006年ａ型とｂ型の二つが認められました。従来に比べて同年にはさらにヨーロッパでも集団発生、食中毒が多発しました。同年に日本も集団発生、食中毒がものすごく増大し、集団発生、食中毒が連日マスコミで報道されました。日本では2006/2007年および2007/2008年シーズンにはＧⅡ/４.2006年ｂ型で起きました。ＧⅡ/４.2006年ａ型による集団発生は日本でほとんど起きていませんでした。2008/2009年の冬のシーズンにひょっとしたらＧⅡ/４.2006年ａ型による集団発生が起きれば、大流行になることが予想されると２、３の雑誌に書いて注意報を出したのですが、幸いなことに外れて、2008/2009年の冬のシーズンにまだ大流行がみられていません。しかし、将来的にはこの株による大流行が起こる可能性があります。

ノロウイルス食中毒の今後の問題点

ノロウイルスの今後ですが、ノロウイルスは、生きていくために絶えず人から人への感染が必要です。ノロウイルスにとっては、下水処理場ができ、水洗便所になって感染の機会が減ってくることで、排泄量の少ないノロウイルス株は人から人への感染ができず、自然消滅します。そのためノロウイルスのうちでも排泄量の多いものが生き残ってきます。ふん便には大量のウイルスが存在し、ちょっとした不注意で、大規模な食中毒・感染症を起こす危険性があります。

また、ノロウイルスによる嘔吐が強い株が残ってきます。嘔吐物は人が処理します。処理するときに人に感染を起こし、さらに雑巾、バケツ、洗い場等の身の周りを汚染し、感染が起きます。もう一つは、やはりノロウイルスが変異して、病原性が強いものに変わるなどのことが起きてきます。近年、先進国の欧米でもノロウイルスの集団発生・食中毒は増加しております。

日本では腸管感染症と言われる赤痢、コレラ、チフスはほぼ撲滅されていますが、ノロウイルスはまだしばらくの間暴れるだろうと言えます。

ノロウイルスの食中毒・感染症の予防は古くから言われている、加熱と手洗いでその多くを予防することができます。

奨励賞　受賞記念講演録

食品衛生微生物の簡易迅速検査法の開発と有効性の評価、食品衛生向上手法の開発

川崎　晋
独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所　研究員

食品総合研究所は、食品を作る立場として、おいしい・便利な・新鮮なといった付加価値を生み出すことにより、よりよい食品を提供していこうと、研究員一同努力しています。その中で私は、安全性という食品製造の根底にある仕事に携わっており、微生物の迅速検査法について研究しています。社会的背景においても、昨今の食中毒事例の多発により、食品開発にはこれまでより高い安全性と信頼性を付加したものでなければ消費者に受け入れられないという現状があります。では、食品の安全性担保のために、食品工場で検査体制を強化せよという議論がありますが、これは現実的には難しい。なぜなら、通常、一般生菌数を検査するには２日を要し、ましてや食中毒検査には５日から１週間以上の時間と労力を要します。もちろん、微生物取り扱いが可能な人材の確保も難しい問題です。こうした背景から、なんとかこれらの点を解消できる迅速な自主衛生検査法を開発し、各食品工場現場に受け入れられる情報を提示することができれば、食品衛生の向上に大いに貢献できるのではないかと考えたわけです。

迅速検査法の考え方

しかし、衛生検査方法の開発というと、食中毒事例の犯人捜しのツールを開発するという考えになりがちですが、食品製造現場では犯人捜しのツールというだけでなくもう一歩踏み込んだ積極的な使い方ができないかということを、私は考えております。なぜなら、食品製造業界が考えているのは、安全性を付加価値にした新しい商品開発という目的もあるからです。もう一つ、農水省の意向には、効率よく食べ物を利用したいという、そういう概念もあるでしょう。これらを踏まえたうえで、付加価値を付けていかねばならない、と考えています。その中で、迅速検査法は製造現場でどのような活用が期待できるかを考えると、例えば原材料、これに病原菌汚染がない、きれいなものだと検証できれば、加熱を緩和してよりおいしい付加価値のある食品にできるのではないかと思います。逆に、汚染されていることが事前にわかれば、加熱してきちんと殺菌してから、食べられる食品にしてしまおうという、よりよい商品を供給するために必要な原材料の判別の意志決定に使える可能性がでてきます。このようなことができるには今のところ技術が進歩していませんので無理ですが、このように効率よく食品を使うことができるツールの提案が私の考える迅速検査技術の最終的なゴールだと考えて、普及を視野に入れた研究開発をしています。

既存技術を食品製造現場に生かす

実際に今の技術ではまだそこまでは追い付いていない現状がありますが、製造現場で困っている現実があるのは事実です。食品製造現場でいろいろな人にインタビューしてみると、いろいろな回答が返ってきます。私も各種の迅速検査技術の中で、既存の技術をどう現場対応できるよう役立ててもらおうかというところが、やはり興味のあるところです。

しかしすべての製造現場での要望に適合できるオールマイティーな検査法というのはないと思われましたので、要望のカテゴリーを三つに分けることにしました。いろいろな食品企業があるなかで、例えば大企業であれば、「食中毒菌検査」まで実施できるようにしたいという高度な要望がある。これには技術要求レベルも難易度が高く、コストも高い、作業量も多いが解決したいということになります。

逆に、病原微生物検査までのレベルは要らないので、「微生物計測」を簡易迅速に測定したいという要望もあります。それよりもっと零細のいわゆる家内工場では、「日常の汚染検査」を手軽にできれば十分だという要望もあるでしょう（図１～２）。そこで、私はこれらを三つのカテゴリーに区分し、技術開発や評価について考えていこうということで仕事を進めました。

顧客ニーズによる三つのカテゴリー

この三つのカテゴリーについてそれぞれ技術開発・評価したテーマを二つずつご紹介します（図３）。

まず、食中毒菌迅速検査については、「食中毒菌の同時迅速検査法の開発」と、「カンピロバクターの同定検出法の開発」という研究をしました。

一般微生物検査法については、「酸素電極法による迅速微生物測定法」と、「化学発光法による微生物生菌の迅速検査法」の開発に携わってきました。

日常迅速衛生管理法としては、微生物の検査を行わずに衛生管理を評価する方法として、「タンパク質のふき取り検査法による有効性」と、「簡易・安価な温度管理評価法の開発」について研究を進めてきたので、ご紹介します。

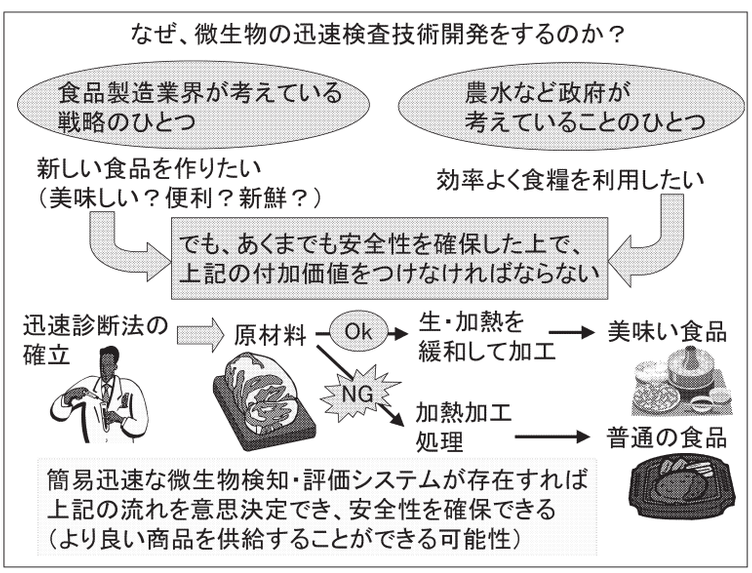

図１　研究の背景

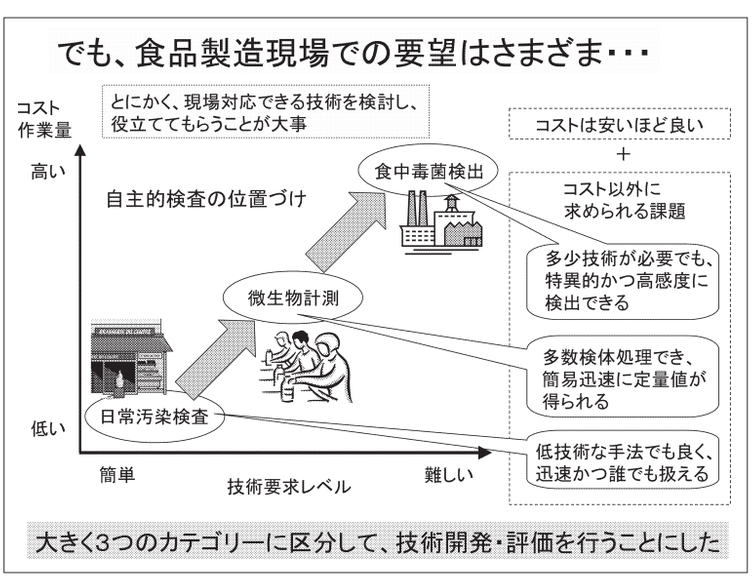

図２　食品製造現場での要望

カテゴリー１：食中毒菌迅速検査

まず、食中毒菌の同時迅速検査法について、食中毒発生件数が多数あり、死亡例も報告されているサルモネラ、リステリア・モノサイトゲネス、O157の３菌種の食中毒菌をまとめて検査する遺伝子技術をつくろうということで、プリマハム基礎研究所と共同で研究開発を行ってきました。従来の方法では培養に培養を重ねて４日以上の時間を必要とします。一方、われわれの開発技術（多重検出法）ではこれを１日に短縮するために、三つの技術開発を行いました。一つは、サルモネラ・リステリア・O157を、共通して増菌できる「新しい増菌培地」を開発しました。もう一つは、できるだけ有機溶媒のようなフェノールとか吸着カラムを使わない抽出法を開発して、食品に対応できる「DNA抽出法」を考えました（図４）。さらに、サルモネラ・リステリア・O157が検出されるとそれぞれ

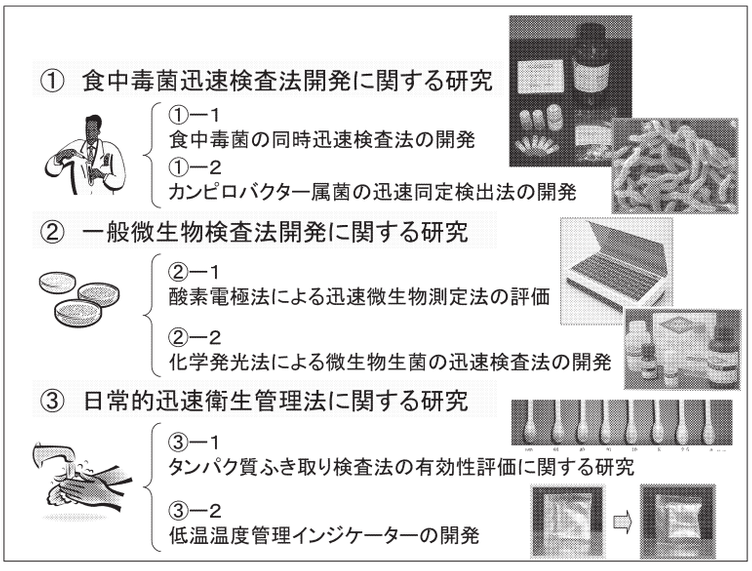

図３　これまでの研究の概要

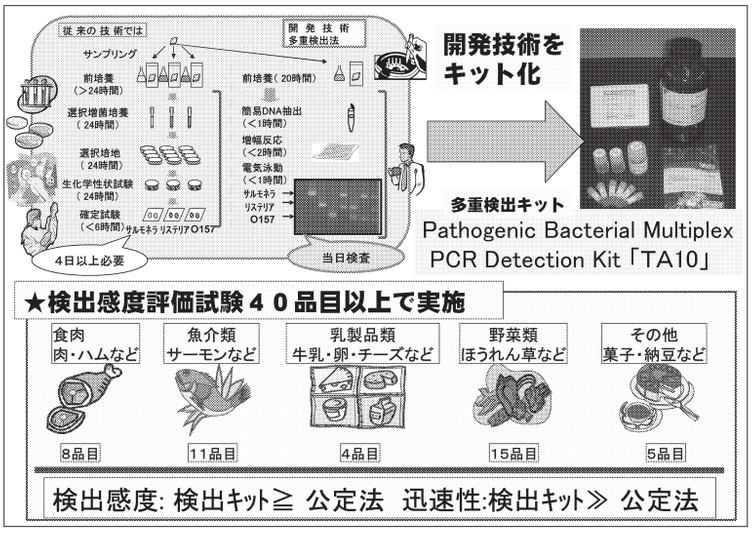

図４　食中毒菌の同時迅速検査法の開発（①－１）

異なる箇所にバンドが出るといった「遺伝子増幅の反応系」をつくり、迅速かつ簡便な方法を開発できたわけです。これは、平成17年開発当時に『読売新聞』の１面に掲載され、論文を発表し、非常に高い評価が得られたわけですが、平成21年１月、ようやく検査キットとしてプリマハム基礎研究所とタカラから発売されました。われわれはこの検出システムをＴＡ10シリーズと名付けました。ＴＡ10というのは「多重（たじゅう）」という駄じゃれです。このキットを用いて、検査対象食品として肉、サーモン、チーズ、野菜など、その他各種の食品について評価試験を行ったわけですが、その結果と公定法とを比較したところ、ほとんど問題ないという結果が得られ、この結果は同月、国際誌[*1]に掲載されました。

先ほどの、サルモネラ、リステリア、O157も食中毒事故を起こし、莫大な経済損失を生んでいるわけですが、近年カンピロバクターについても注目が集まっています。米国をはじめ世界中でも多数の事例と損失があると報告されています。ところが、このカンピロバクターは、非常に培養が難しく、検査法が難しいという状況がありましたので、われわれは米国農務省研究所のPina Fratamico氏と協力してカンピロバクター検出のための共同研究を始めることにしました。この成果は、平成20年12月に第１回日本カンピロバクター研究会でも発表させていただきましたが、このようにカンピロバクターの*C. jejuni*、*C. coli*、*C. lari*など様々な菌種を、PCR-RFLP法やPCR法により同定できる方法を開発いたしました（図５）。これについて日米共同で特許出願し、ASMの学術誌[*2]に載せることができたということが今回の成果です。この成果を今後どのように使っていこうか、考えていきたいと思っています。

カテゴリー２：一般微生物の検出法

では、今度は一般微生物の検出法に関する研究をご紹介します。一つは、「酸素電極法」といい、「インピーダンス法」と非常に似たシステムです。電流の変化を代謝の産物の変化ととらえて、その経時変

*1　Susumu Kawasaki, Pina M. Fratamico, Naoko Horikoshi, Yukio Okada, Kazuko Takeshita, Takashi Sameshima, and Shinichi Kawamoto. (2009) Evaluation of a Multiplex PCR System for Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157 : H7 in Foods and in Food Subjected to Freezing. Foodborne Pathogens and Disease. 6 : 81-89.

*2　S. Kawasaki, P. M. Fratamico, I.V. Wesley, and S. Kawamoto. (2008) Species-specific identification of *Campylobacter* strains using PCR and PCR-RFLP targeting the gyrase B gene. Appl. Environ. Microbiol. 74 : 2529-2533.

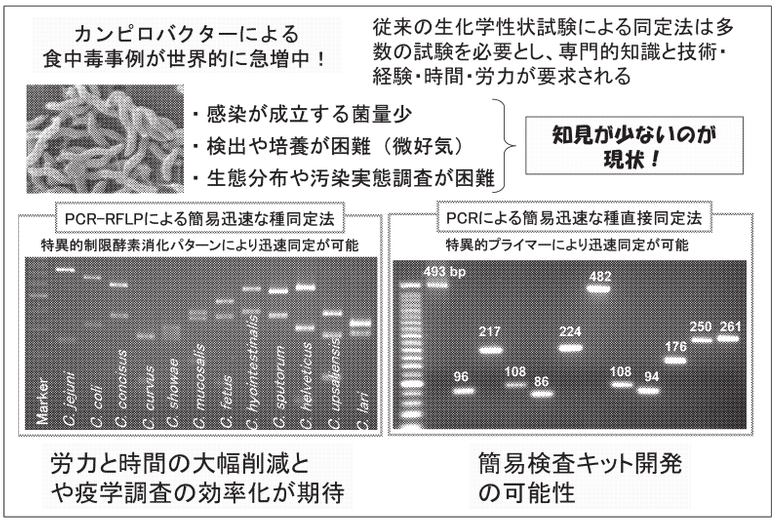

図５　カンピロバクター属菌の迅速同定検出法の開発（①－２）

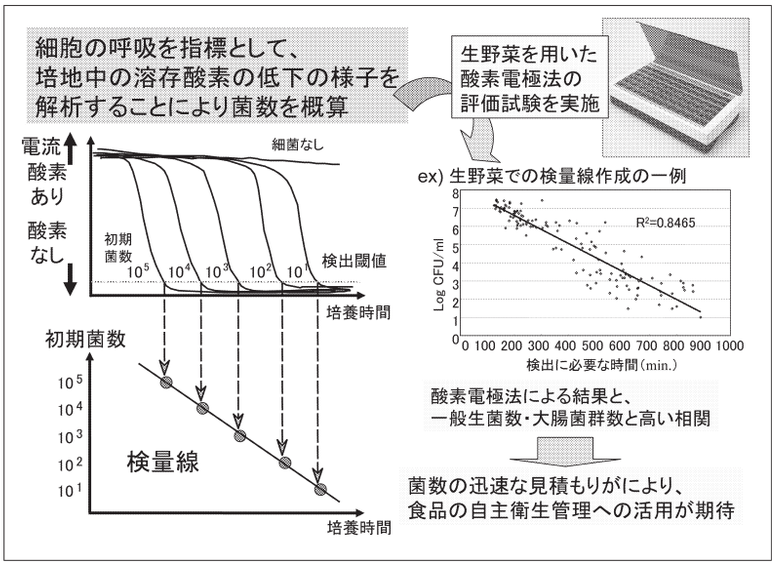

図６　酸素電極法による迅速微生物測定法の評価（②－１）

化のモニタリング結果から検量線を作成するというシステムが当時出ていたので、これを評価しようということです。当時、生野菜について評価試験をし、一般生菌数・大腸菌群数が従来の培養法と、おおむね高い相関があることを確認いたしました（図６）。現在、その大腸菌群が、果たしてこれが生野菜の衛生指標になるかは未定ですが、少なくともこういう簡易な酸素電極法が、実際に使える可能性を見いだしたという報告をしました。

もう一つは、「化学発光法による微生物の迅速検査法の開発」に関する研究です。これは、詳しくは『日本食品微生物学会雑誌』*3と『食品衛生学雑誌』*4に総説と解説が掲載されていますが、キノン系の触媒により生細胞からラジカルを出させて発光させるという、生きた微生物による発光をとらえるというシステムを食品分野に実用化できないか検討を行いました。最終的にはこの技術は農林水産省の補助事業によりキット化ができました。試薬開発は日研生物医学研究所、機器開発はアトー株式会社を主体に３者の共同で研究して、実用化に至りました。これはモデルケース実験の一つですが、ある乳業メーカーと共同で試験的に実施しました。牛乳には大腸菌群について規格が定められておりますが、検査の場合にはBGLB培地で培養を行い48時間培養後に判定するのが一般的手法です。ここで化学発光法を使えば16時間から18時間で結果が得られるため、時間の短縮ができるだろうという結果になりました（図７）。最終的に化学発光法は時間が大幅に短縮でき検査コストも削減できるという結論になりました。

カテゴリー3：日常迅速衛生管理法

このように、微生物の生菌検査の開発もしておりますが、例えば計測機器の購入や使用すら難しい食品製造現場の環境では、もっと簡単に・迅速に・誰でもでき、現場ですぐに判定できるような手法について、何か情報を提供してくれという要望も、食品製造業の皆さんのインタビューの中でかなりあるわけです。そこで、微生物検査を行わないで、製品ラインの汚染を的確に、迅速に測定できる方法を検討

*3 「日本食品微生物学会雑誌　23(1), 6-12, 2006　化学発光法の原理と自主衛生検査への応用. 山庄司志朗、川崎晋、浅川篤、川本伸一、一色賢司」

*4 「食品衛生学雑誌　47(2), J 171-J 177, 2006　化学発光法による生菌の迅速検出法. 川崎晋、山庄司志朗、浅川篤、一色賢司、川本伸一」

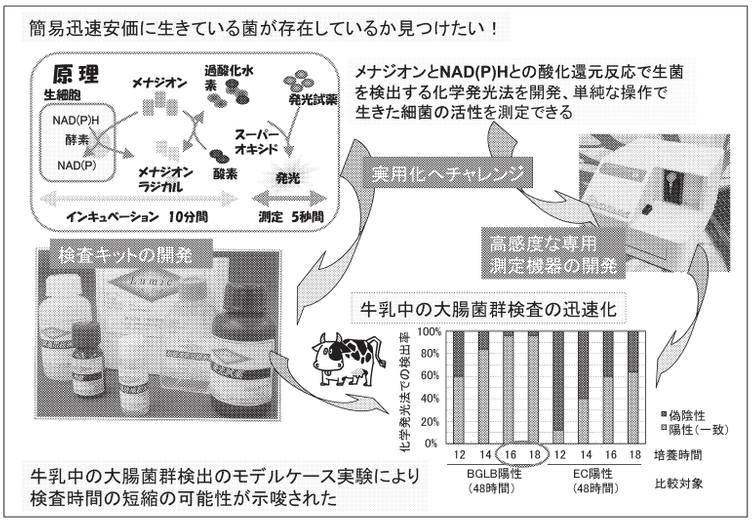

図７　化学発光法による微生物生菌の迅速検査法の開発（②－２）

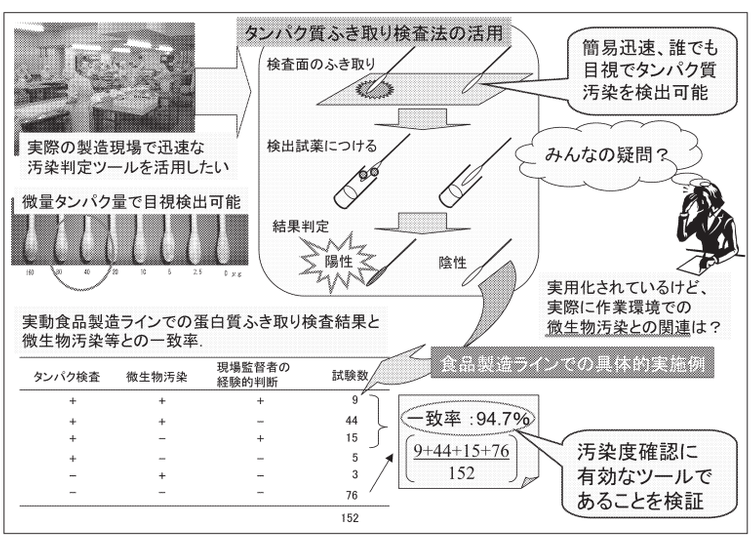

図８　タンパク質ふき取り検査法の有効性評価に関する研究（③－１）

いたしました。着目したのは、「タンパク質ふき取り検査法」です。「タンパク質ふき取り検査法」は、すでに実用化されていて、いろいろなキットが出ていますが、単純かつその場で誰でも判定が可能な方法にもかかわらず、なかなか普及しない現状があります。それはなぜかというと、このキットはタンパク質を検査している、つまり汚れを検査しているが微生物検査をしていない点で、信用ならないという評価を受けているからです。確かにそのとおりだが、だからといって一概に使えないと言い切るのはおかしいと考えて、具体的実施例を出そうという研究をしました。それで、実際に稼働している食品製造ラインから152カ所ふき取って、タンパクふき取り検査と微生物汚染と、そのときの目視判断、すなわち現場監督者の経験的判断結果を比較してみました。このようにタンパク質検査が陽性となるものに関しては、何らかの微生物汚染や、現場監督者が汚れていると判断できた、というものがほとんどでした。また、微量なタンパク質だけが検出されたケースが５件ありました。さらに一番評価したいところは、タンパク検査が陽性でしかも微生物検査でも陽性となりましたが目視検査では見逃してしまった、というケースが152検体中44検体もあったということです。すなわち、「タンパク質ふき取り検査法」のように何らかの客観的検査ツールを導入する意味はやはりあるのだということです（図８）。結局、最終的に計算したところ、「タンパク質ふき取り検査法」と微生物検査や目視検査との一致率は94.7％と、非常に高い一致率を得たため、あながち「タンパク質ふき取り検査法」が微生物汚染と相関がないわけではないと考えられます。このような具体的実施例という結果でありますが、このような単純な手法でも食品衛生の向上に非常に威力を発揮するツールだということを、学会誌*5に論文として公表したわけです。

もう一つ、食中毒の予防に関しては、温度制御ということも一つの問題になっています。要するに、予防原則として微生物を増やさないということです。増やさないということが重要なファクターになる一方で、食品工場から家庭まですべての状況においての温度制御が適切であったかという検証ができないため、なかなか流通時の温度不備がないことを

*5 「日本食品微生物学会雑誌　23(4), 230-236, 2006. 蛋白質ふき取り法による食品製造現場での自主衛生検査の活用法とその有効性. 川崎 晋、山中俊介、川本伸一」

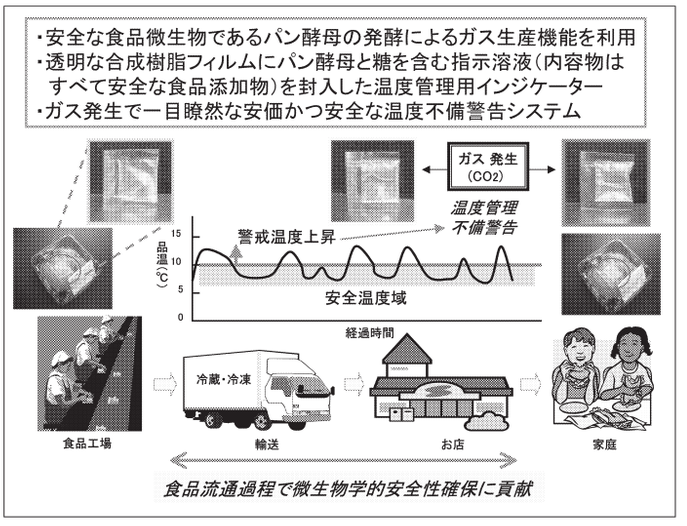

図９　低温温度管理インジケーターの開発（③－２）

保証できないという現状があります。そこで、大成ラミックという小袋に無菌充填できるメーカーと共同で、２センチ角の図９のような小袋を作りました。この小袋の中にパン酵母とグルコースなどが入れてあります。適当な温度に一定時間さらされると、この中で酵母が糖を分解してガスを発生させることを利用して、温度異常が起これば一目で分かるシステムを考えました。例えば弁当や惣菜の箱にインジケーター小袋を取付けて、一つ一つにオーダーメード的にどれだけの温度履歴の時にガスを発生させるかなどの要望にも応えることで、最終的に流通過程における安全性確保に貢献できるのではないか（図９）、という提案をいたしました。

終わりに

このように、いろいろな迅速検査法の開発とその活用について、可能性を模索し、普及のための結果を公表してきたわけです。しかし、私が思うに、研究開発に携わる者は「迅速検査法はみんな便利に使ってくれるに違いない」と思って開発するばかりで、実際はなかなかケーススタディーの段階まで至らないために、「本当に事業者が使えるのか？」という疑問にお答えすることができないようです。そこで、われわれはそれを見込んで、いろいろな企業とタイアップしながらこういう研究開発や評価試験をしてきているわけですが、実際の食品製造現場では往々にして多くの問題が発生しますし、さらには食品工場において導入試験を行うほどの人材や経費に余裕がないのも事実です。

さらに、公定法という言葉が食品製造業界に非常に強く認識されていて、食品メーカーが、自主衛生管理のために簡易・迅速法を導入し、活用していくことに躊躇することが多いのではないだろうか。やはり公定法でなければ検査法として受け容れられず、食品製造現場では、なかなかアクティブに自主衛生管理手法の導入が進まないというのも事実のようです。食品製造現場にフィットするような、安全を提供できる簡易・迅速な検査法の手引やそのような方法の普及・支援が求められているのではないかと、最近感じておるところです。

最後に、今回お話しさせていただいた研究は多数の方々との御協力により成り立っております。関係者方々に深く感謝申し上げます。ありがとうございました。